

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) **EP 0 761 817 A2**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
12.03.1997 Patentblatt 1997/11

(51) Int. Cl.⁶: **C12P 7/24**, C12N 1/20
// C11B9/00, (C12N1/20,
C12R1:01)

(21) Anmeldenummer: 96113289.1

(22) Anmeldetag: 20.08.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH DE FR GB IT LI NL

• **Hopp, Rudolf, Dr.**
37603 Holminda (DE)

(30) Priorität: **01.09.1995 DE 19532317**

(71) Anmelder: **HAARMANN & REIMER GMBH**
D-37601 Holminda (DE)

(74) Vertreter: **Petrovicki, Wolfgang, Dr.**
Bayer AG
Konzernverwaltung RP
Patente Konzern
51368 Leverkusen (DE)

(72) Erfinder:
• **Rabenhorst, Jürgen, Dr.**
37671 Höxter (DE)

(54) **Verfahren zur Herstellung von Vanillin und dafür geeignete Mikroorganismen**

(57) Mit Hilfe von neu entdeckten Mikroorganismen aus der Gattung *Pseudonocardia* läßt sich aus Ferulasäure Vanillin in hohen Ausbeuten gewinnen.

EP 0 761 817 A2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein fermentatives Verfahren zur Herstellung von Vanillin aus Ferulasäure und für dieses Verfahren geeignete Mikroorganismen.

Vanillin ist ein wichtiger, in der Nahrungs- und Genußmittel-Industrie viel verwendeter Aromastoff. Bislang wird es hauptsächlich aus dem Lignin der Sulfitaugen, gelegentlich auch durch Oxidation von Eugenol oder Isoeugenol auf chemischem Wege hergestellt. Das auf diese Weise erhaltene Vanillin hat jedoch den Nachteil, daß es im lebensmittelrechtlichen Sinne kein Naturstoff ist und deshalb auch nicht als natürlicher Aromastoff bezeichnet werden darf.

Der natürliche Aromastoff Vanillin ist bisher nur durch Extraktion von Vanilleschoten erhältlich; das auf diese Weise erhaltene natürliche Vanillin ist jedoch sehr teuer. Natürliche Aromastoffe sind chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, gewonnen durch geeignete physikalische Verfahren (einschließlich Destillation und Extraktion mit Lösungsmitteln), durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die als solche verwendet oder mittels herkömmlicher Lebensmittelzubereitungsverfahren (einschließlich Trocknen, Rösten, Fermentieren) für den menschlichen Verzehr aufbereitet werden.

Verschiedene andere Verfahren zur Herstellung von natürlichem Vanillin mit unterschiedlichen Mikroorganismen und Enzymen sind in der Zwischenzeit veröffentlicht worden, liefern aber bislang aufgrund der nur recht geringen Ausbeuten bzw. Konzentrationen keine Produkte auf dem Markt; vgl. EP-A 405 197, 453 368 und 542 348, US-PS 5 128 253, JP-A 267 268 (25.10.1988) und 267 284 (25.10.1988).

In der wissenschaftlichen Literatur wird bei ganz verschiedenen Organismen das Auftreten von Vanillin beim Abbau von Ferulasäure als Intermediärprodukt beschrieben, aber in der Regel keine Konzentrationsangaben gemacht; vgl. S. Toms et al., "The Degradation of trans-Ferulic Acid by *Pseudomonas acidovorans*" in *Biochemistry* **9** (1970), 337-343; J.B. Sutherland et al., "Metabolism of Cinnamic, p-Coumaric and Ferulic Acid by *Streptomyces setonii*" in *Can. J. Microbiol.* **29** (1983), 1253-1257; G. Ötük, "Degradation of Ferulic Acid by *Escherichia coli*" in *J. Ferment. Technol.* **63** (1985), 501-506; S. Nazareth et al., "Degradation of Ferulic Acid via 4-Vinylguaiacol by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc." in *Can. J. Microbiol.* **32** (1986) 494-497; M. Rahouti et al., "Metabolism of Ferulic Acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*" in *Appl. Environm. Microbiology* **55** (1989), 2391-2398).

Teilweise sind die angegebenen Stämme auch nicht in Stammsammlungen hinterlegt und daher für Versuche anderer nicht zugänglich.

Auf der Suche nach einem neuen, praktisch anwendbaren Herstellungsverfahren für natürliches Vanillin aus günstig verfügbaren Ausgangsstoffen wurde jetzt überraschenderweise gefunden, daß dieses

auf wirtschaftliche Weise mit Hilfe von bestimmten Bakterien aus der Gruppe der Actinomyceten in guten Ausbeuten und Konzentrationen durch Umsetzung von natürlicher Ferulasäure erhalten wird.

Gegenstand der Erfindung sind also neue *Amycolatopsis* species aus der Gattung *Pseudonocardia* mit den bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig unter den Nummern DSM 9991 und DSM 9992 hinterlegten Stämmen.

Aufgrund der chemotaxonomischen Untersuchungsergebnisse wurden beide Isolate der Gattung *Amycolatopsis* (Familie *Pseudonocardiaceae*) zugeordnet. Die Identifizierung basierte auf folgenden fünf Merkmalen:

1. Diagn. Aminosäure des Peptidoglycans: meso-Diaminopimelinsäure;
2. Diagn. Zucker aus Ganzzellhydrolysaten: Arabinose und Galaktose;
3. Mycolsäuren: fehlen;
4. Menachinone: MK - 9 (H₄);
5. Fettsäuremuster: Iso/Anteiso- + 10methyl-verzweigte gesättigte und ungesättigte Fettsäuren plus 2-Hydroxy-Fettsäuren. Dieses Fettsäuremuster ist diagnostisch für Vertreter der Gattung *Amycolatopsis*.

Da DSM 9991 und DSM 9992 auch das typische Erscheinungsbild der Vertreter der Gattung *Amycolatopsis* zeigen - beige bis gelbes Substratmycel und auf einigen Medien auch ein feines weißes Luftmycel - wird die Zuordnung von DSM 9991 und DSM 9992 zur Gattung *Amycolatopsis* zusätzlich durch die Morphologie unterstützt.

Der Vergleich der Fettsäuremuster der beiden Stämme mit den Einträgen der DSM-Fettsäure-Datenbanken durch eine Hauptkomponentenanalyse ergab für beide Stämme eine Zuordnung zu *Amycolatopsis mediterranei*. Der Similaritätsindex ist aber in beiden Fällen zu niedrig (0,037 und 0,006), um eine definitive Spezies-Zuordnung zuzulassen.

Zusätzlich durchgeführte Analysen der 16S rDNA und der Vergleich der diagnostischen Partialsequenzen mit den 16S rDNA Datenbandeinträgen von *Amycolatopsis* Typus Stämmen, unterstützen die Ergebnisse der Fettsäureuntersuchungen. Auch bei den 16S rDNA Sequenzen konnte keine hohe Homologie zu den bekannten *Amycolatopsis* Typus Stämmen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Fettsäure-Ergebnissen, bei denen keine Unterschiede in den Mustern der beiden Isolate gefunden wurden, war es mithilfe der 16S rDNA Sequenzen möglich, DSM 9991 und DSM 9992 zu differenzieren. Aufgrund der großen Unterschiede in den 16S rDNA Sequenzen (Similarität 99,6 %), kann davon ausgegangen werden, daß DSM 9991 und DSM 9992 Stämme von jeweils eigenständigen bisher unbeschriebenen *Amycolatopsis* Spezies sind.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfah-

ren zur Herstellung von Vanillin aus Ferulasäure in Gegenwart von neuen Amycolatopsis sp. oder deren Enzymen oder von Mikroorganismen mit genetischem Material aus obigen Amycolatopsis sp., das die Struktur- und Regulatorgene für die Enzyme kodiert, die in dieser Reaktion wirksam sind.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des so hergestellten Vanillins zur Herstellung von Aromen.

Die als Ausgangsmaterial bevorzugte natürliche Ferulasäure kann unter anderem aus natürlichem Eugenol durch Umsetzung mit Pseudomonas sp. DSM 7062 oder DSM 7063 erhalten werden (DE-OS 4 227 076).

Der Organismus kann in einem üblichen Kulturmedium in für die Kultivierung von Mikroorganismen üblichen Weise kultiviert werden. Das Substrat kann zu Beginn der Inkubation, während oder nach Abschluß des Wachstums auf einmal oder über einen längeren Zeitraum verteilt zugegeben werden. Die Menge an Ferulasäure wird dabei vorteilhaft so bemessen, daß die Konzentration der Verbindung in der Kulturbrühe 80 g/l, vorzugsweise 15 g/l nicht überschreitet. Der Verlauf der Umsetzung kann durch Bestimmung des Ausgangsmaterials und des Produkts in der Kulturbrühe mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie verfolgt werden. Nachdem die optimale Menge an Vanillin entstanden ist, wird dieses durch bekannte physikalische Verfahren wie Extraktion, Destillation oder Chromatographie aus der Kulturbrühe isoliert. Das so erhaltene Rohprodukt kann durch weitere Schritte gereinigt werden.

Die Kultivierung des erfindungsgemäßen Mikroorganismus kann in synthetischen, halbsynthetischen oder komplexen Kulturmedien erfolgen. Diese Kulturmedien enthalten Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze und gegebenenfalls Spurenelemente und Vitamine.

Als Kohlenstoffquellen können z.B. Zucker wie Glucose, Zuckeralkohole wie Glycerin oder Mannit, organische Säuren wie Zitronensäure oder komplexe Gemische wie Malzextrakt, Hefeextrakt, Casein oder Caseinhydrolysat dienen.

Beispiele für geeignete Stickstoffquellen sind anorganische Stickstoffquellen wie Nitrate und Ammoniumsalze und organische Stickstoffquellen wie Hefeextrakt, Sojamehl, Baumwollsaatmehl, Casein, Caseinhydrolysat, Weizengluten und Maisquellwasser.

Als anorganische Salze können beispielsweise unter anderem Sulfate, Nitrate, Chloride, Carbonate und Phosphate von Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium, Zink und Eisen verwendet werden.

Die Kultivierungstemperatur liegt vorzugsweise im Bereich von 10 bis 55°C, besonders bevorzugt im Bereich von 35 bis 45°C. Der pH-Wert des Mediums beträgt bevorzugt 3 bis 9, insbesondere 4 bis 8. Die Kultivierung kann entweder in geeigneten Schüttelapparaturen oder in Fermentern mit Mischeinrichtung erfolgen. Bei der Kultivierung ist für eine ausreichende Belüftung

Sorge zu tragen. Die Kultivierung kann batchweise, halbkontinuierlich oder kontinuierlich durchgeführt werden. Die Kulturdauer bis zum Erreichen einer maximalen Produktmenge liegt zwischen 4 und 120 Stunden nach dem Animpfen der Kultur. Um die Mikroorganismen vor der toxischen Wirkung der eingesetzten bzw. gebildeten Substanzen zu schützen, kann es vorteilhaft sein, den Kulturmedien Adsorptionsmittel zuzusetzen, z.B. Aktivkohle oder Adsorberharze wie [®]Amberlite XAD-2, [®]Amberlite XAD-7, XAD-16, [®]Lewatit OC 1062 oder OC 1064.

Die Prozentangaben der nachfolgenden Beispiele beziehen sich jeweils auf das Gewicht.

15 Beispiele

Beispiel 1

Herstellung der Vorkultur

Ein 500 ml Erlenmeyerkolben mit seitlichem Einstich wurde mit 100 ml Medium, bestehend aus 1 g Malzextrakt, 0,4 g Glucose und 0,4 g Hefeextrakt ad 100 ml Wasser, gefüllt und anschließend 20 Minuten bei 121°C sterilisiert. Nach dem Abkühlen wurde der Kolben mit 200 µl einer eingefrorenen Glycerinkultur Amycolatopsis sp. DSM 9991 oder DSM 9992 beimpft. Die Kultur wurde auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 45°C und 100 Upm inkubiert. Nach 24 Stunden wurde diese Kultur zur Beimpfung des Produktionsmediums verwendet.

Beispiel 2

35 Produktion im Schüttelkolben

Acht 500 ml Erlenmeyerkolben mit seitlichem Einstich wurden mit je 100 ml Medium (4 g/l Glucose, 10 g/l Malzextrakt und 4 g/l Hefeextrakt) gefüllt und anschließend 20 Minuten bei 121°C dampfsterilisiert.

Nach dem Abkühlen wurden die Kolben mit je 2 ml einer Kultur von Amycolatopsis sp. DSM 9992 aus Beispiel 1 angeimpft. Die Kulturen wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 37°C und 100 Upm inkubiert.

16 Stunden nach dem Animpfen wurden 20 ml, nach 24 Stunden 40 ml und nach 44 Stunden nochmals 10 ml einer 3,3%igen steriltfiltrierten Ferulasäurelösung zu jedem Kolben zugegeben. Nach 47 Stunden wurde die Kulturbrühe der Kolben vereinigt und der Gehalt an Vanillin und nicht umgesetzter Ferulasäure bestimmt.

Der Gehalt an Vanillin in der Kulturbrühe lag gemäß HPLC-Analysen bei 7317 ppm. 1526 ppm Ferulasäure waren noch nicht umgesetzt. Das Endgewicht der Kultur der 8 Kolben betrug 1420 g. Dies ist eine Umsetzung von ca. 72 % der Theorie, bezogen auf die umgesetzte Ferulasäure.

Beispiel 3**Produktion von Vanillin im 10 l Fermenter**

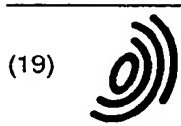
5 l Kulturmedium (4 g/l Glucose, 10 g/l Malzextrakt und 6 g/l Hefeextrakt) wurden in einem Fermenter sterilisiert und nach Abkühlen mit 100 ml einer Vorkultur von DSM 9992 gemäß Beispiel 1 angeimpft.

Die Kulturbedingungen waren: 37°C, 500 Upm, 5 l Luft/Min. 12,5 Stunden nach dem Animpfen wurden 1,634 kg einer ca. 3,7%igen Ferulasäurelösung (60,2 g Ferulasäure) zugegeben. Nach 17,5 Stunden wurden über einen Zeitraum von 10 Stunden weitere 4,397 kg einer ca. 3,7%igen Ferulasäurelösung (164,72 g Ferulasäure) zugepumpt.

Nach 32 Stunden wurde die Fermentation abgebrochen. Die Konzentration an Vanillin lag bei 11,5 g/l und es lag noch 1 g/l nicht umgesetzte Ferulasäure vor. Das Endvolumen betrug 11,29 l. Dies ist eine Umsetzung von 77,8 % der Theorie, bezogen auf umgesetzte Ferulasäure.

Patentansprüche

1. Amycolatopsis sp. aus der Gattung Pseudonocardia mit den bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig unter den Nummern DSM 9991 und DSM 9992 hinterlegten Stämmen.
2. Verfahren zur Herstellung von Vanillin aus Ferulasäure in Gegenwart von Amycolatopsis sp. DSM 9991 oder DSM 9992 oder dessen Enzymen oder von Mikroorganismen mit genetischem Material aus Amycolatopsis sp. DSM 9991 oder DSM 9992, das die Struktur- und Regulatorgene für die Enzyme kodiert, die in dieser Reaktion wirksam sind.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wonach man als Ausgangskomponente natürliche Ferulasäure einsetzt.
4. Verwendung des nach Verfahren gemäß Ansprüchen 2 und 3 hergestellten Vanillins zur Herstellung von Aromen.



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 0 761 817 A3**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(88) Veröffentlichungstag A3:
18.08.1999 Patentblatt 1999/33

(43) Veröffentlichungstag A2:
12.03.1997 Patentblatt 1997/11

(21) Anmeldenummer: 96113289.1

(22) Anmeldetag: 20.08.1996

(51) Int. Cl.⁶: **C12P 7/24**, C12N 1/20
// C11B9/00, (C12N1/20,
C12R1:01)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH DE FR GB IT LI NL

(30) Priorität: 01.09.1995 DE 19532317

(71) Anmelder: **HAARMANN & REIMER GMBH**
D-37601 Holzminden (DE)

(72) Erfinder:
• Rabenhorst, Jürgen, Dr.
37671 Höxter (DE)

• Hopp, Rudolf, Dr.
37603 Holminda (DE)

(74) Vertreter:
Petrovicki, Wolfgang, Dr.
Bayer AG
Konzernbereich RP
Patente und Lizenzen
51368 Leverkusen (DE)

(54) **Verfahren zur Herstellung von Vanillin und dafür geeignete Mikroorganismen**

(57) Mit Hilfe von neu entdeckten Mikroorganismen aus der Gattung *Pseudonocardia* läßt sich aus Ferulasäure Vanillin in hohen Ausbeuten gewinnen.

EP 0 761 817 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 96 11 3289

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
D,A	EP 0 405 197 A (HAARMANN & REIMER GMBH) 2. Januar 1991 * das ganze Dokument *	1-4	C12P7/24 C12N1/20 //C11B9/00, (C12N1/20, C12R1:01)
A	WO 94 02621 A (MANE V FILS SA ;MANE JEAN (FR); ZUCCA JOSEPH (FR)) 3. Februar 1994 * Seite 1, Spalte 1 - Seite 3, Spalte 36; Tabelle 1 *	1-4	
D,A	US 5 128 253 A (LABUDA IVICA M ET AL) 7. Juli 1992 * Spalte 2, Zeile 1 - Spalte 3, Zeile 53 *	1-4	
D,A	SUTHERLAND J B ET AL: "METABOLISM OF CINNAMIC, P-COUMARIC, AND FERULIC ACIDS BY STREPTOMYCES SETONII" CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, Bd. 29, Nr. 10, 1. Januar 1983, Seiten 1253-1257, XP000650324 * das ganze Dokument *	1-4	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			C12P
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Die Recherchenabteilung ist der Auffassung, daß ein oder mehrere Ansprüche, den Vorschriften des EPU in einem solchen Umfang nicht entspricht bzw. entsprechen, daß sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik für diese Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Siehe Ergänzungsblatt C</p>			
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	
MÜNCHEN		9. Juni 1999	
		Prüfer	
		Bilang, J	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN			
<p>X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet</p> <p>Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</p> <p>A: technologischer Hintergrund</p> <p>O: nichtschriftliche Offenbarung</p> <p>P: Zwischenliteratur</p> <p>T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E: älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>D: in der Anmeldung angeführtes Dokument</p> <p>L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>&: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 03/92 (Pa/C09)



Europäisches
Patentamt

UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE
ERGÄNZUNGSBLATT C

Nummer der Anmeldung

EP 96 11 3289

Vollständig recherchierte Ansprüche:

1, 3, 4

Unvollständig recherchierte Ansprüche:

2

Grund für die Beschränkung der Recherche:

Anspruch 2 betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Vanillin in Gegenwart von Mikroorganismen, welche genetisches Material aus *Amycolatopsis* sp. DSM 9991 oder DSM 9992 enthalten. Die Anmeldung enthält keinerlei Informationen über dieses genetische Material.

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 96 11 3289

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patendokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

09-06-1999

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0405197 A	02-01-1991	DE 3920039 A	03-01-1991
		DE 59002803 D	28-10-1993
		DK 405197 T	15-11-1993
		JP 3030683 A	08-02-1991
		US 5017388 A	21-05-1991
WO 9402621 A	03-02-1994	FR 2694020 A	28-01-1994
		AT 173296 T	15-11-1998
		DE 69322067 D	17-12-1998
		EP 0606441 A	20-07-1994
		JP 7500253 T	12-01-1995
		US 5712132 A	27-01-1998
US 5128253 A	07-07-1992	CA 2069361 A	01-12-1992
		JP 5244965 A	24-09-1993
		US 5279950 A	18-01-1994

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82